

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-164287

(P2003-164287A)

(43) 公開日 平成15年6月10日 (2003. 6. 10)

(51) Int. Cl.

識別記号

F 1

テ-マ-ト (参考)

C 1 2 N 15/09

Z N A

A 0 1 K 11/00

Z 4 B 0 2 4

A 0 1 K 11/00

67/027

4 B 0 6 3

67/027

C 1 2 Q 1/68

Z

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数24 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2001-366120 (P2001-366120)

(22) 出願日 平成13年11月30日 (2001. 11. 30)

(71) 出願人 501463719

独立行政法人肥飼料検査所

埼玉県さいたま市北袋町一丁目21-2

(71) 出願人 501167644

独立行政法人農業生物資源研究所

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(72) 発明者 草間 豊子

千葉県柏市根戸470-25-711

(72) 発明者 門脇 光一

茨城県つくば市吾妻3-19-1, 2-201

(74) 代理人 100104673

弁理士 南條 博道

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プライマー配列

(57) 【要約】

【課題】 動物由来DNA配列を特異的に検出する方法を提供すること。

【解決手段】 ミトコンドリアゲノムのATP合成酵素サブユニット8遺伝子配列に由来するそれぞれの動物特異的遺伝子配列をプライマー対とし、試料中のDNAを鋳型として、DNA断片をPCR法により増幅する工程、および該増幅されたDNA断片を検出する工程を含む、動物種識別方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ミトコンドリアゲノムのA T P合成酵素サブユニット8 遺伝子配列に由来する動物特異的遺伝子配列をプライマー対とし、試料中のDNAを鋳型として、DNA断片をPCR法により増幅する工程、および該増幅されたDNA断片を検出する工程を含む、動物種識別方法。

【請求項2】 前記動物が哺乳動物である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記プライマー対が、配列表の配列番号1の配列と配列表の配列番号2の配列との組み合わせである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記動物が反芻動物である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記プライマー対が、配列表の配列番号3の配列と配列表の配列番号4の配列との組み合わせである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記動物がウシである、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記プライマー対が、以下の組み合わせ：配列表の配列番号7の配列と配列表の配列番号11の配列；配列表の配列番号7の配列と配列表の配列番号10の配列；配列表の配列番号9の配列と配列表の配列番号11の配列；配列表の配列番号8の配列と配列表の配列番号10の配列；配列表の配列番号9の配列と配列表の配列番号10の配列；および、配列表の配列番号6の配列と配列表の配列番号10の配列；からなる群より選択される組み合わせである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記動物がブタである、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記プライマー対が、配列表の配列番号13の配列と配列表の配列番号14の配列との組み合わせである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記動物がヒツジである、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記プライマー対が、配列表の配列番号17の配列と配列表の配列番号18の配列との組み合わせである、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記動物がヤギである、請求項1に記載の方法。

【請求項13】 前記プライマー対が、配列表の配列番号19の配列と配列表の配列番号20の配列との組み合わせである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記動物がニワトリである、請求項1に記載の方法。

【請求項15】 前記プライマー対が、配列表の配列番号23の配列と配列表の配列番号24の配列との組み合わせである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記試料が、牛肉、肉加工食品、肉加工品含有食品、血液、体毛、体液、乳、肉骨粉、および

肉骨粉含有飼料からなる群より選択される、請求項1から15のいずれかの項に記載の方法。

【請求項17】 配列表の配列番号1の配列と配列表の配列番号2の配列との組み合わせである、哺乳動物特異的遺伝子配列検出用プライマー対。

【請求項18】 配列表の配列番号3の配列と配列表の配列番号4の配列との組み合わせである、反芻動物特異的遺伝子配列検出用プライマー対。

【請求項19】 以下の組み合わせ：配列表の配列番号7の配列と配列表の配列番号11の配列；配列表の配列番号7の配列と配列表の配列番号10の配列；配列表の配列番号9の配列と配列表の配列番号11の配列；配列表の配列番号8の配列と配列表の配列番号10の配列；配列表の配列番号9の配列と配列表の配列番号10の配列；および配列表の配列番号6の配列と配列表の配列番号10の配列；からなる群より選択される組み合わせである、ウシ特異的遺伝子配列検出用プライマー対。

【請求項20】 配列表の配列番号13の配列と配列表の配列番号14の配列との組み合わせである、ブタ特異的遺伝子配列検出用プライマー対。

【請求項21】 配列表の配列番号17の配列と配列表の配列番号18の配列との組み合わせである、ヒツジ特異的遺伝子配列検出用プライマー対。

【請求項22】 配列表の配列番号19の配列と配列表の配列番号20の配列との組み合わせである、ヤギ特異的遺伝子配列検出用プライマー対。

【請求項23】 配列表の配列番号23の配列と配列表の配列番号24の配列との組み合わせである、ニワトリ特異的遺伝子配列検出用プライマー対。

【請求項24】 配合飼料中に含まれる動物由来の成分を検出する方法であって、ミトコンドリアゲノムのA T P合成酵素サブユニット8 遺伝子配列に由来する動物特異的遺伝子配列をプライマー対とし、試料中のDNAを鋳型として、DNA断片をPCR法により増幅する工程、および該増幅されたDNA断片を検出する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動物種識別方法およびそれに用いるプライマー対配列に関する。詳細には、ミトコンドリアゲノムA T P合成酵素サブユニット8 遺伝子配列に由来する動物特異的遺伝子配列を増幅する工程を含む動物種識別方法、および該増幅工程で使用するプライマー対配列に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、牛海綿状脳症（B S E）の牛に由来する肉骨粉が飼料に添加され、その飼料を与えられた牛がB S Eに罹患し、問題となっている。そして、B S Eと類似する病気が種々の家畜にも存在する可能性が指摘されている。そこで、B S Eの発生以来、先端技術を

用いた鋭敏な動物種の検出技術の開発が、必要となっており、特に行政上の緊急対応事項となっている。

【0003】動物種識別については、従来、免疫学的手法、ならびに核遺伝子を用いる遺伝子識別手法が用いられてきた。免疫学的手法としては、例えば、ELISA法、イムノブロット法が挙げられる。核遺伝子を用いる遺伝子識別手法としては、例えば、PCR法が挙げられる。しかし、加熱処理されている肉骨粉などは、タンパク質の変性や核酸の断片化が生じている可能性が高いこと、および肉骨粉混入飼料には植物由来成分が多く、動物由来成分について微量分析が必要であることなど、現在行われている動物種識別方法には、多くの問題点がある。このように加熱処理後サンプルについても実施可能な、感度が高くかつ有効な検出方法の開発が急務である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、免疫学的手法あるいは核遺伝子を用いる遺伝子識別手法以外に、微量混入する動物由来成分の動物種を検出し、同定する方法が望まれている。特に、家畜あるいはペットに与える飼料中に、どのような動物の肉あるいは肉骨粉が使用されているかを検出することは重要であり、大量に存在する植物の遺伝子、あるいは他の動物種の遺伝子の中から、微量存在する特定の動物由来遺伝子のみを検出の対象とする、感度の高い検出方法が望まれている。

【0005】

【課題を解決するための手段】発明者らは、母性遺伝し、核遺伝子と比較してコピー数の多い、ミトコンドリアゲノムに着目し、ミトコンドリア遺伝子を動物種識別の対象にして検討した。その中で、発明者らは、動物ミトコンドリアゲノムに存在するATP合成酵素サブユニット8遺伝子(atp8遺伝子)が、植物(イネ)ミトコンドリアゲノムに存在しないことを明らかにして、植物系の飼料中の微量の動物遺伝子を検出する材料となり得ること、およびこの動物ミトコンドリアatp8遺伝子の特定の配列を利用して動物種を識別できることを見出し、本発明を完成させた。

【0006】したがって、本発明は、ミトコンドリアゲノムのATP合成酵素サブユニット8遺伝子配列に由来する動物特異的遺伝子配列をプライマー対とし、試料中のDNAを鋳型として、DNA断片をPCR法により増幅する工程、および該増幅されたDNA断片を検出する工程を含む、動物種識別方法を提供する。

【0007】好適な実施態様では、上記動物は哺乳動物であり、より好適には、上記プライマー対は、配列表の配列番号1の配列と配列表の配列番号2の配列との組み合わせである。

【0008】好適な実施態様では、上記動物は反芻動物であり、より好適には、上記プライマー対は、配列表の配列番号3の配列と配列表の配列番号4の配列との組み

合わせである。

【0009】好適な実施態様では、上記動物はウシであり、より好適には、上記プライマー対は、以下の組み合わせ：配列表の配列番号7の配列と配列表の配列番号11の配列；配列表の配列番号7の配列と配列表の配列番号10の配列；配列表の配列番号9の配列と配列表の配列番号11の配列；配列表の配列番号8の配列と配列表の配列番号10の配列；配列表の配列番号9の配列と配列表の配列番号10の配列；および、配列表の配列番号6の配列と配列表の配列番号10の配列；からなる群より選択される組み合わせである。

【0010】好適な実施態様では、上記動物はブタであり、より好適には、上記プライマー対は、配列表の配列番号13の配列と配列表の配列番号14の配列との組み合わせである。

【0011】好適な実施態様では、上記動物はヒツジであり、より好適には、上記プライマー対は、配列表の配列番号17の配列と配列表の配列番号18の配列との組み合わせである。

【0012】好適な実施態様では、上記動物はヤギであり、より好適には、上記プライマー対が、配列表の配列番号19の配列と配列表の配列番号20の配列との組み合わせである。

【0013】好適な実施態様では、上記動物はニワトリであり、より好適には、上記プライマー対は、配列表の配列番号23の配列と配列表の配列番号24の配列との組み合わせである。

【0014】別の好適な実施態様では、上記試料は、生肉、肉加工食品、肉加工品含有食品、血液、体毛、体液、乳、肉骨粉、および肉骨粉含有飼料からなる群より選択される。

【0015】本発明はまた、配列表の配列番号1の配列と配列表の配列番号2の配列との組み合わせである、哺乳動物特異的遺伝子配列検出用プライマー対を提供する。

【0016】本発明はまた、配列表の配列番号3の配列と配列表の配列番号4の配列との組み合わせである、反芻動物特異的遺伝子配列検出用プライマー対を提供する。

【0017】本発明はまた、以下の組み合わせ：配列表の配列番号7の配列と配列表の配列番号11の配列；配列表の配列番号7の配列と配列表の配列番号10の配列；配列表の配列番号9の配列と配列表の配列番号11の配列；配列表の配列番号8の配列と配列表の配列番号10の配列；配列表の配列番号9の配列と配列表の配列番号10の配列；および配列表の配列番号6の配列と配列表の配列番号10の配列；からなる群より選択される組み合わせである。ウシ特異的遺伝子配列検出用プライマー対を提供する。

【0018】本発明はまた、配列表の配列番号13の配

列と配列表の配列番号 14 の配列との組み合わせである、ブタ特異的遺伝子配列検出用プライマー対を提供する。

【0019】本発明はまた、配列表の配列番号 17 の配列と配列表の配列番号 18 の配列との組み合わせである、ヒツジ特異的遺伝子配列検出用プライマー対を提供する。

【0020】本発明はまた、配列表の配列番号 19 の配列と配列表の配列番号 20 の配列との組み合わせである、ヤギ特異的遺伝子配列検出用プライマー対を提供する。

【0021】本発明はまた、配列表の配列番号 23 の配列と配列表の配列番号 24 の配列との組み合わせである、ニワトリ特異的遺伝子配列検出用プライマー対を提供する。

【0022】本発明はさらに、配合飼料中に含まれる動物由来の成分を検出する方法を提供し、この方法は、ミトコンドリアゲノムの ATP 合成酵素サブユニット 8 遺伝子配列に由来する動物特異的遺伝子配列をプライマー対とし、試料中の DNA を鋳型として、DNA 断片を PCR 法により増幅する工程、および該増幅された DNA 断片を検出する工程を含む。

【0023】

【発明の実施の形態】ミトコンドリアゲノムは、酸化的リン酸化（電子伝達系）に必要な酵素類の生合成に必須であり、ATP 合成酵素、シトクロム c オキシダーゼなどがミトコンドリア DNA 上にコードされている。ATP 合成酵素は、いくつかのサブユニットから構成されており、上述のように、発明者らは、ATP 合成酵素サブユニット 8 遺伝子 (atp8 遺伝子) が、動物ミトコンドリアゲノムに存在するが、植物 (イネ) ミトコンドリアゲノムに存在しないことを見出した。そして、これによって、飼料中に植物由来の DNA が大量に存在するにもかかわらず、動物種を識別できることが可能となった。

【0024】動物の atp8 遺伝子は、いくつか知られている。例えば、ウシの atp8 遺伝子配列 (ウシ) を基準とし、いくつかの動物種における atp8 遺伝子配列を、ウシとの相同性が最大となるようにアラインしたものを、図 1 に示す。図 1 においては、1:ウシ、2:アルバカ、3:ネコ、4:イヌ、5:ヤギ (1)、6:ヤギ (2)、7:ウマ、8:カモシカ、9:マウス、10:ウサギ、11:ラット、12:ロバ、13:ヒツジ、14:シカ、15:マコウクジラ、および 16:ナガスクジラの atp8 遺伝子の遺伝子配列を示す。なお、図の矢印は、ウシの atp8 構造遺伝子の始まりの位置を示す。

【0025】また、図 2 は、ウシ、ニワトリ、およびブタの atp8 遺伝子をアラインしたものを示す。

【0026】図 1 および図 2 に示すように、atp8 遺

伝子には遺伝子の多様性がある。この多様性を利用して、各種動物における特異的配列を検出することにより、各動物種の識別が可能である。

【0027】各種動物を識別するために、それぞれの動物種に特異的な DNA 配列を検出する方法としては、サザンブロット法、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法などが挙げられるが、微量の DNA 試料でも検出が可能な点、および精度を向上させる点で、本発明においては PCR 法が好ましく用いられる。本発明における PCR は、目的の動物種に特異的な DNA 配列を含む一対のプライマーを用いて行い、増幅された DNA 断片を検出する。

【0028】PCR 法は、例えば、以下のように行われる。まず、atp8 遺伝子配列中の目的の動物種に特徴的な配列を有するいくつかの領域から、プライマーとして 2 箇所を選択し、それぞれのプライマーを合成する。プライマーは、それぞれ約 20 ヌクレオチドの長さである。この一対のプライマーを用いて、プライマーに挟まれた領域の DNA 断片を PCR によって増幅する。次いで、増幅された DNA 断片を含む試料について電気泳動を行って、該 DNA 断片の有無を検出する。

【0029】プライマーは、任意の約 20 ヌクレオチド長さの DNA 配列であり、公知のデータベースの各種動物の atp8 遺伝子配列のアラインメントに基づいて適宜選択される。例えば、哺乳動物に特異的な遺伝子の検出を目的とする場合、哺乳動物間で相同性が高く、かつ、非哺乳動物とは相同性が低い領域を選択すればよく、特定の動物に特異的な遺伝子の検出を目的とする場合は、その動物に特異的であり、かつ、他の動物とは相同性の低い領域を選択すればよい。プライマーは、対として使用するため、5' 側および 3' 側の 2 箇所の領域を選択する。プライマーとして選択可能な領域が 2 箇所よりも多い場合は、種々の組み合わせのプライマーを用い得る。

【0030】例えば、図 3 は、ウシのミトコンドリア atp8 遺伝子の配列であり、図中に示す記号は、ウシ特異的遺伝子を検出するためのプライマーとして用い得る領域 (配列) である。また、哺乳動物を特異的に検出するための配列 (anicon5 (配列番号 1) および anicon3 (配列番号 2)) と、反芻動物を特異的に検出するための配列 (rumicon5 (配列番号 3) および rumicon3 (配列番号 4)) も図 3 に併せて示す。詳細は実施例において記述するが、例えば、5' 側のプライマーとして anicon5 を、3' 側のプライマーとして anicon3 を用いると、哺乳動物特異的な遺伝子配列を検出できる。同様に、rumicon5 と rumicon3 とをプライマーとして用いると、反芻動物特異的な遺伝子配列を検出できる。また、5' 側のプライマーとして、cow5 (配列番号 5)、cow51 (配列番号 6)、cow52 (配列番号 7)、cow53 (配列番号 8)、および cow54 (配列番号 9) のいずれかを、3' 側

のプライマーとして、cow3（配列番号10）あるいはcow31（配列番号11）を用いる。例えば、cow52とcow31、cow52とcow3、cow54とcow31、cow53とcow3、cow54とcow3、およびcow51とcow3の各プライマー対は、ウシ特異的遺伝子配列を検出できる。

【0031】また、図1および図2に示す四角で囲まれた領域は、それぞれの動物種を特異的に検出するための実験に用いた配列の例を示す。

【0032】プライマーとして選択された領域のDNA配列は、通常用いられる方法によって合成される。一般的には、DNA自動合成機を用いて支持体上でヌクレオチドを伸長し、次いで、脱保護および支持体からの切断を行う。次いで、通常用いられる方法（例えば、カラムクロマトグラフィー）によって精製して、目的のプライマーを得ることができる。

【0033】測定される試料としては、生肉、肉加工食品、肉加工品含有食品、血液、体毛、体液、乳、肉骨粉、肉骨粉含有飼料などが挙げられる。試料からのミトコンドリアDNAの抽出は、例えば、以下のように行う。約50mg～500mgの試料（例えば、生肉の場合50mg、乾燥粉体試料の場合100～500mg）を、約10倍量の緩衝液に懸濁し、ビーズ破砕法で破砕した後、市販の組織細胞ミトコンドリアDNA抽出キット（例えば、和光純薬工業製）を用いて抽出する。このようなキットは、組織細胞中のゲノムDNAの混入が少なく、より高純度のミトコンドリアDNAを回収するものであり、遠心分離、沈殿採取などによるDNAの抽出、濃縮操作などを行う。このようにして、試料中に存在する大量のゲノムDNAの混入が低いミトコンドリアDNAを効率的に抽出できる。

【0034】プライマーの使用量は、特に制限されないが、一般的に、約0.4μMで使用することが好ましい。

【0035】前処理した試料について、上記の選択したプライマー対を用いてPCRを行って、プライマーに挟まれた領域のDNA断片を増幅する。PCRは、通常行われる条件で実施され、各プライマー対についてそれぞれ適切な条件を設定する。例えば、まず95℃で9分熱変性した後、変性：92℃、1分；アニーリング：40～65℃、2分；伸長：72℃、2分の反応を、30～60サイクル繰り返し、最後に72℃、5分反応させてPCRを終了する。DNAポリメラーゼとしては、通常AmpliTaqGOLDポリメラーゼが用いられる。プライマー対によって増幅されたPCR産物（DNA断片）の大きさは、選択されたプライマー対間の塩基数に応じて変動するが、約120～約180bpであり得る。このPCR産物は、次いで、上記DNA断片を分離できる条件下で、例えば、アガロースゲル電気泳動を行う。

【0036】電気泳動したゲルのDNA断片は、当業者が通常用いるエチジウムブロマイド染色、蛍光検出、サザンハイブリダイゼーションなどの検出手段によって

検出され得る。

【0037】このようにして、試料中に目的の動物種由来のDNAが存在していれば、増幅されたDNA断片がゲル上で検出され得る。検出限界は、用いるプライマー対の種類および組み合わせ、試料の量、PCR条件、検出方法などの種々のファクターによって異なり得る。適切な条件を選択すれば、微量の試料においても、高感度でDNAの存在を検出することができる。例えば、適切な条件を選択すれば、試料がウシ由来の肉骨粉を含む配合飼料である場合、特定のウシ特異的なプライマー対を用いて、0.001重量%の牛肉骨粉の混入でさえも検出することが可能である。

【0038】なお、以下に述べる実施例においては、プライマー配列が特定されて示されているが、本発明はその例に限定されることを意図していない。そのプライマー配列を含み、あるいはその配列において1または2以上の塩基配列の置換を含み、ハイブリダイズの条件を変えることによって、目的のDNAとハイブリダイズし得、特定の動物種を特異的に検出し得る配列もまた、本発明の範囲に含まれることはいうまでもない。

【0039】

【実施例】（プライマーの合成）図1および図2に示す各種動物のa t p 8 遺伝子配列のアラインメントに基づいて、以下の各実施例または比較例に用いるプライマー領域を選択した。選択した領域のDNA配列を、DNA自動合成機を用いて合成した。

【0040】（実施例1：哺乳動物由来DNA配列の特異的検出）肉牛、乳牛、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ウサギ、クジラ、ニワトリ、タラ、サケ、イワシ、カニ、エビ、およびアサリの15種類の肉試料から、ミトコンドリアDNAを以下のように調製した。各肉試料を10倍量の緩衝液（10mM Tris-HCl, pH 7.5, 20mM EDTA, pH 7.5）に懸濁し、ビーズ破砕法で破砕した後、市販の組織細胞ミトコンドリアDNA抽出キット（和光純薬工業製）を用いてDNAを抽出した。

【0041】それぞれのDNA試料を鋳型とし、anicon5（配列番号1）とanicon3（配列番号2）とを、それぞれ5'側および3'側プライマーとして用いて、PCRを行った。PCRの条件は以下の通りである：反応緩衝液（10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001%(W/V)ゼラチン）；95℃で9分熱変性した後、変性：92℃、1分；アニーリング：50℃、2分；伸長：72℃、2分の反応を45サイクル繰り返し、最後に72℃、5分反応させた。反応終了後、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色してPCR産物（DNA断片）を検出した。結果を図4に示す。図中のMは分子量マーカーである。

【0042】図4から明らかなように、anicon5（配列番号1）およびanicon3（配列番号2）をプライマーとして用いて、それぞれの動物由来のDNAを鋳型とする

PCRにより、哺乳動物においてのみ、増幅されたDNA断片の生成が認められた(矢印のバンド位置)。すなわち、anicon5(配列番号1)およびanicon3(配列番号2)をプライマー対とすることにより、種々の動物肉試料の中から、哺乳動物由来のDNAのみを特異的に検出できることが示された。したがって、anicon5(配列番号1)とanicon3(配列番号2)との組み合わせは、哺乳動物に属する動物種を特異的に検出するプライマー対である。図3に、哺乳動物検出のためのプライマーとして用い得る領域を示した。

【0043】(実施例2:反芻動物由来DNA配列の特異的検出)実施例1と同様に調製した15種類のDNA試料を鋳型とし、rumicon5(配列番号3)とrumicon3(配列番号4)とを、それぞれ5'側および3'側プライマーとして用いて、PCRを行った。PCRの条件は以下の通りである:95℃で9分熱変性した後、変性:92℃、1分;アニーリング:45℃、2分;伸長:72℃、2分の反応を、45サイクル繰り返し、最後に72℃、5分反応させた。反応終了後、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色してPCR産物(DNA断片)を検出した。結果を図5に示す。

【0044】図5は、rumicon5(配列番号3)およびrumicon3(配列番号4)をプライマーとして用いて、それぞれの動物由来のDNAを鋳型とするPCRにより、反芻動物である肉牛、乳牛、ヒツジ、およびヤギに由来するDNA断片が生成することが認められた(矢印のバンド位置)。一方、反芻動物に属さない動物のDNAからは、PCR産物(DNA断片)は検出できなかった。すなわち、rumicon5およびrumicon3をプライマー対とすることにより、種々の動物肉試料の中から、反芻動物由来のDNAのみを特異的に検出できることが示された。したがって、rumicon5(配列番号3)とrumicon3(配列番号4)との組み合わせは、反芻動物由来の動物種を特異的に検出するプライマー対である。図3に、反芻動物検出のためにプライマーとして用い得る領域を示した。

【0045】なお、rumicon5(配列番号3)におけるrは、gとaとのミックスであり、kはgとtとのミックスである。すなわち、rumicon5(配列番号3)は混合プライマーであるが、それぞれが単独で使用され得ることは当業者に明白である。

【0046】(実施例3:ウシ由来DNA配列の特異的検出)表1に記載の種々のプライマー対を用いて、ウシ由来DNA配列の特異的検出を試みた。ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタおよびニワトリの肉から調製したDNAを鋳型として、アニーリングの条件を表1の条件とした以外は、実施例1と同条件でPCRを行った。結果を図6～

8に示す。

【0047】

【表1】

プライマー		アニーリング	結果	図
5' cow51	配列番号:6	55℃ 2分	○	図6
3' cow3	配列番号:10			
5' cow52	配列番号:7	52℃ 2分	○	図7
3' cow3	配列番号:10			
5' cow53	配列番号:8	52℃ 2分	○	図7
3' cow3	配列番号:10			
5' cow54	配列番号:9	52℃ 2分	○	図7
3' cow3	配列番号:10			
5' cow5	配列番号:5	52℃ 2分	×	図7
3' cow31	配列番号:11			
5' cow51	配列番号:6	56℃ 2分	×	図8
3' cow31	配列番号:11			
5' cow52	配列番号:7	52℃ 2分	○	図8
3' cow31	配列番号:11			
5' cow53	配列番号:8	56℃ 2分	×	図8
3' cow31	配列番号:11			
5' cow54	配列番号:9	56℃ 2分	○	図8
3' cow31	配列番号:11			
5' cow5	配列番号:5	46℃ 2分	×	なし
3' cow3	配列番号:10			

【0048】図6に示す結果は、cow51(配列番号6)およびcow3(配列番号10)をプライマー対として用いた場合に、ウシ由来の肉から得られるPCR産物(DNA断片)と同じ大きさのDNA断片が、ヒツジ、ヤギ、ブタおよびニワトリのDNAを鋳型とした場合には生じなかったことを示す。図7のcow52とcow3との組み合わせ、および図8のcow52とcow31との組み合わせは、他の動物種で類似するDNA断片が検出されていない点で、特にウシ特異的検出に適切なプライマー対であることがわかる。一方、図7に示すように、cow5(配列番号5)およびcow31(配列番号11)のプライマー対を用いた場合に、ヒツジにおいて、わずかにウシのDNAを鋳型として得られるDNA断片と同じ大きさのバンドが見られた。同様に、図8では、cow51(配列番号6)およびcow31(配列番号11)のプライマー対、ならびにcow53(配列番号8)およびcow31(配列番号11)のプライマー対を用いた場合にも、ウシのDNAを鋳型として得られるDNA断片と同じ大きさのバンドが見られた。したがって、これらのプライマー対は、ウシ特異的な検出をするには、適切な組み合わせではない。

【0049】(実施例4:ブタ由来DNA配列の特異的検出)表2に記載の種々のプライマー対を用いて、ブタ由来DNA配列の特異的検出を試みた。ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、およびニワトリの肉から調製したDNAを鋳型として、アニーリングの温度を表2の温度に変えた以外は、実施例1と同条件でPCRを行った。

【0050】

【表2】

プライマー		アニーリング	結果	図
5' pig5	配列番号:12	46°C 2分	×	なし
3' pig3	配列番号:14			
5' pig51	配列番号:13	58°C 2分	○	図9
3' pig3	配列番号:14			
5' pig5	配列番号:12	46°C 2分	×	なし
3' pig31	配列番号:15			
5' pig5	配列番号:12	46°C 2分	×	なし
3' pig32	配列番号:16			
5' pig51	配列番号:13	55°C 2分	×	なし
3' pig31	配列番号:15			
5' pig51	配列番号:13	55°C 2分	×	なし
3' pig32	配列番号:16			

【0051】pig51（配列番号13）とpig3（配列番号14）とをプライマー対として用いた結果を図9に示す。図9から明らかなように、ブタ由来試料においてのみ、DNA断片を検出した（矢印のバンド位置）。したがって、このプライマー対は、ブタ由来DNA配列の特異的検出に有用である。なお、図に示していないが、pig5（配列番号12）とpig3（配列番号14）；pig5（配列番号12）とpig31（配列番号15）；pig5（配列番号12）とpig32（配列番号16）；pig51（配列番号13）とpig31（配列番号15）；pig51（配列番号13）とpig32（配列番号16）との組み合わせは、いずれも特異的検出には適切ではなかった。

【0052】（実施例5：ヒツジ由来DNA配列の特異的検出）sheep5（配列番号17）とsheep3（配列番号18）とを、それぞれ5'側および3'側プライマーとして、ヒツジ由来DNA配列の特異的検出を試みた。ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、およびニワトリの肉から調製したDNAを鋳型として、アニーリングの条件を46°C、2分とした以外は、実施例1と同条件でPCRを行った。結果を図10に示す。

【0053】この結果、sheep5（配列番号17）とsheep3（配列番号18）とをプライマー対として用いることにより、ヒツジ由来DNA配列の特異的検出が可能となることが示された。

【0054】（実施例6：ヤギ由来DNA配列の特異的検出）goat5（配列番号19）とgoat3（配列番号20）＊

＊とを、それぞれ5'側および3'側プライマーとして用いて、ヤギ由来DNA配列の特異的検出を試みた。ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、およびニワトリの肉から調製したDNAを鋳型として、アニーリングの条件を46°C、2分とした以外は、実施例1と同条件でPCRを行った。結果を図10に示す。

【0055】この結果、goat5（配列番号19）とgoat3（配列番号20）とをプライマー対として用いることにより、ヤギ由来DNA配列の特異的検出が可能となることが示された。

【0056】また、goat5（配列番号19）とgoat31（配列番号21）とをプライマー対とし、アニーリングの条件を54°C、2分とした以外は、上記と同様にPCRを行ったところ、ヤギ由来DNA配列の特異的検出には適切ではなかった（図示せず）。

【0057】（実施例7：ニワトリ由来DNA配列の特異的検出）表3に記載の種々のプライマー対を、それぞれ5'側および3'側プライマーとして用いて、ニワトリ由来DNA配列の特異的検出を試みた。ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、およびニワトリの肉から調製したDNAを鋳型として、アニーリングの条件を表3に記載の条件とした以外は、実施例1と同条件でPCRを行った。chick5（配列番号22）とchick3（配列番号24）とをプライマー対として用いた場合の結果を図11に示す。

【0058】

【表3】

プライマー		アニーリング	結果	図
5' chick5	配列番号:22	46°C 2分	○	図1
3' chick3	配列番号:24			
5' chick51	配列番号:23	50°C 2分	×	なし
3' chick3	配列番号:24			
5' chick5	配列番号:22	50°C 2分	×	なし
3' chick31	配列番号:25			
5' chick51	配列番号:23	60°C 2分	×	なし
3' chick31	配列番号:25			

【0059】図11から明らかなように、chick5（配列番号22）とchick3（配列番号24）とをプライマー対として用いることにより、ニワトリ由来DNA配列の特異的検出が可能である（矢印のバンド位置）。

【0060】chick51（配列番号23）とchick3（配列番号24）、chick5（配列番号22）とchick31（配列

番号25）、およびchick51（配列番号23）とchick31（配列番号25）の、それぞれのプライマー対を用いたときは、ニワトリ由来DNA配列の特異的検出には適切ではなかった（図示せず）。

【0061】（実施例8：配合飼料中の哺乳動物由来DNA配列の検出）家畜用配合飼料（主成分：トウモロコ

シ、マイロ、グルテンフィード、ふすま、米ぬか、大豆油かす、なたね油かす)に所定の割合でウシ由来の肉骨粉(オーストラリア産)を混合した。得られた飼料を500mgとり、上記実施例1と同様に10倍量の緩衝液に懸濁し、ビーズ破砕法で破砕した後、市販の組織細胞ミトコンドリアDNA抽出キット(和光純薬工業製)を用いてミトコンドリアDNAを抽出した。このDNAを鋳型として、実施例1で用いた哺乳動物由来DNA配列を特異的に検出するプライマー対であるanicon5(配列番号1)とanicon3(配列番号2)とを用いて、実施例1と同じ条件でPCRを行った。結果を図12に示す。肉骨粉が0.01重量%含まれている場合でも、哺乳動物由来のDNA配列を検出できることが判明した。

【0062】(実施例9:配合飼料中の反芻動物由来DNA配列の検出)実施例8と同様に配合飼料から抽出したDNAを鋳型として、実施例2で用いた反芻動物由来のDNA配列を特異的に検出するrumicon5(配列番号3)およびrumicon3(配列番号4)のプライマー対を用いて、実施例2と同様の条件でPCRを行った。結果を図13に示す。肉骨粉が0.1~1重量%含まれている*20

*場合でも、反芻動物由来のDNA配列を検出できることが判明した。

【0063】(実施例10:配合飼料中のウシ由来DNA配列の検出)実施例8と同様に配合飼料から抽出したDNAを鋳型として、実施例3で用いたウシ特異的プライマー対であるcow52(配列番号7)およびcow31(配列番号11)を用いて、実施例3と同様の条件でPCRを行った。結果を図14に示す。肉骨粉がわずか0.001重量%しか含まれていない場合でも、ウシ由来のDNA配列を検出できることが判明した。

【0064】

【発明の効果】本発明の方法を用いると、試料中の微量の動物由来DNA配列を高感度で検出することができる。そのため、例えば、飼料中にわずかに混入された肉骨粉の動物種の識別も可能である。特に、家畜用配合飼料に微量のウシ肉骨粉が混入している場合も検出可能である。

【0065】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Sciences

<110> Independent Administrative Institution Fertilizer and Feed Inspection Station

<120> Primer sequences

<130> P101N07219

<160> 25

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

aactagacac gtcaacatga

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

aggttaataa attttcgctc

20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

actcaacrt gactkaca

18

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

15	16
tctgggtttgt gttaraaagt	19
<210> 5	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 5	
qtcacacatga ctgacaaag	19
<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 6	
agacacgtca acatgactg	19
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 7	
atgatcttat caatattctt g	21
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 8	
gacatgccgc aactagacac g	21
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 9	
ctctctttga tgcacatgcc	20
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 10	
tttcaatatt ttatttqga tc	22
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 11	
tcaaggaggta ttttgtttta a	21
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 12	
atgattcatt acaattac	18
<210> 13	

17	18
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 13	
taccacaact agatcacatc	20
<210> 14	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 14	
ttattttctca aggggtgc	18
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 15	
tgaggttcaat tgattctgga c	21
<210> 16	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 16	
tgatllllgag llllgagllc a	21
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 17	
aattctatca atatttttaq t	21
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 18	
ctcaaaqaql atlllglllc	20
<210> 19	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 19	
qccacaacta gacacatcr	19
<210> 20	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 20	
ttctaaagggg tgttatgc	18
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	

19	20
<213> Artificial Sequence	
<400> 21	
ttctgagttg tggtagaagt c	21
<210> 22	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 22	
catcatactc ctaacttg	18
<210> 23	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 23	
ccaaacttga ttacaccllcl c	21
<210> 24	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 24	
tttaggttca tggtcagg	18
<210> 25	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 25	
gttcacggtc aatttcaggq a	21

【図面の簡単な説明】

【図 1】種々の動物由来ミトコンドリア a t p 8 遺伝子の配列アラインメントを示す図である。

【図 2】ニワトリ、ウシ、およびブタのミトコンドリア a t p 8 遺伝子の配列アラインメントを示す図である。

【図 3】ウシ由来 DNA 配列の特異的検出を行うために用いたプライマーの、ミトコンドリア a t p 8 遺伝子上での位置関係を示す図である。

【図 4】哺乳動物特異的配列を有するプライマー対（anicon5 および anicon3）を用いて、各種動物由来の DNA を鋳型とする PCR を行った後の電気泳動の結果を示す写真である。

【図 5】反芻動物特異的配列を有するプライマー対（rumicon5 および rumicon3）を用いて、各種動物由来の DNA を鋳型とする PCR を行った後の電気泳動の結果を示す写真である。

【図 6】ウシ特異的配列を有するプライマー対（cow3 および cow51）を用いて、各種動物由来の DNA を鋳型とする PCR を行った後の電気泳動の結果を示す写真である。

【図 7】種々のウシ特異的配列を有するプライマー対を用いて、各種動物由来の DNA を鋳型とする PCR を行った後の電気泳動の結果を示す写真である。

【図 8】種々のウシ特異的配列を有するプライマー対を用いて、各種動物由来の DNA を鋳型とする PCR を行った後の電気泳動の結果を示す写真である。

【図 9】ブタ特異的配列を有するプライマー対（pig51 および pig3）を用いて、各種動物由来の DNA を鋳型とする PCR を行った後の電気泳動の結果を示す写真である。

【図 10】ヒツジ特異的配列を有するプライマー対（sheep5 および sheep3）およびヤギ特異的配列を有するプライマー対（goat5 および goat3）を用いて、各種動物由来の DNA を鋳型とする PCR を行った後の電気泳動の結果を示す写真である。

【図 11】ニワトリ特異的配列を有するプライマー対を用いて、各種動物由来の DNA を鋳型とする PCR を行った後の電気泳動の結果を示す写真である。

【図 12】ウシ肉骨粉含有家畜用配合飼料における、哺乳動物特異的プライマー対による DNA 検出の結果を示す電気泳動写真である。

【図 13】ウシ肉骨粉含有家畜用配合飼料における、反芻動物特異的プライマー対による DNA 検出の結果を示す電気泳動写真である。

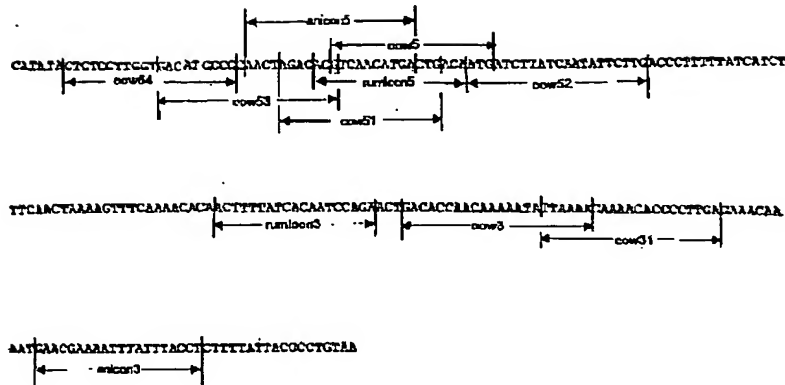
【図 14】ウシ肉骨粉含有家畜用配合飼料における、ウシ特異的プライマー対による DNA 検出の結果を示す電

【圖 1】

1 クレ
 2 アムカ
 3 アム
 4 アム
 5 アム (1)
 6 アム (2)
 7 アム
 8 アム
 9 アム
 10 アム
 11 アム
 12 アム
 13 アム
 14 アム
 15 アム
 16 アム
 17 アム
 18 アム
 19 アム
 20 アム
 21 アム
 22 アム
 23 アム
 24 アム
 25 アム
 26 アム
 27 アム
 28 アム
 29 アム
 30 アム
 31 アム
 32 アム
 33 アム
 34 アム
 35 アム
 36 アム
 37 アム
 38 アム
 39 アム
 40 アム
 41 アム
 42 アム
 43 アム
 44 アム
 45 アム
 46 アム
 47 アム
 48 アム
 49 アム
 50 アム
 51 アム
 52 アム
 53 アム
 54 アム
 55 アム
 56 アム
 57 アム
 58 アム
 59 アム
 60 アム
 61 アム
 62 アム
 63 アム
 64 アム
 65 アム
 66 アム
 67 アム
 68 アム
 69 アム
 70 アム
 71 アム
 72 アム
 73 アム
 74 アム
 75 アム
 76 アム
 77 アム
 78 アム
 79 アム
 80 アム
 81 アム
 82 アム
 83 アム
 84 アム
 85 アム
 86 アム
 87 アム
 88 アム
 89 アム
 90 アム
 91 アム
 92 アム
 93 アム
 94 アム
 95 アム
 96 アム
 97 アム
 98 アム
 99 アム
 100 アム

[illegible]

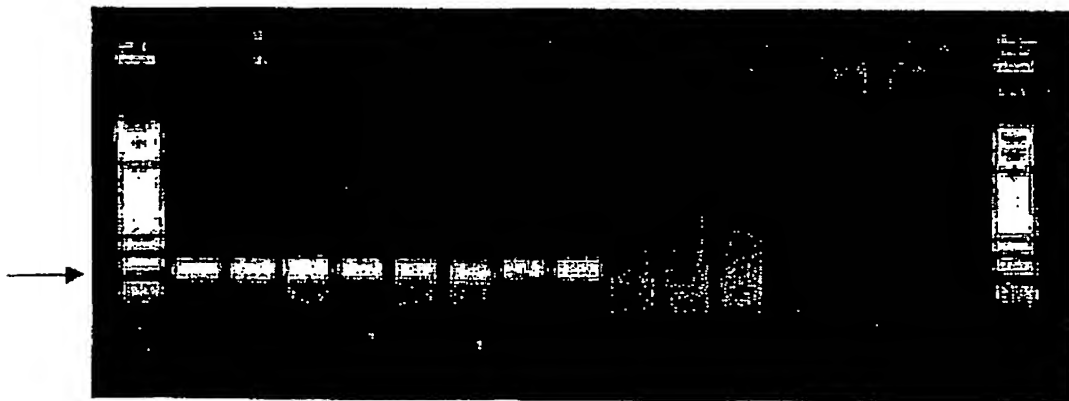
【図3】



【図4】

哺乳動物検出プライマーによるPCR

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M



1 肉牛
2 乳牛
3 ヒツジ
4 ヤギ
5 ブタ

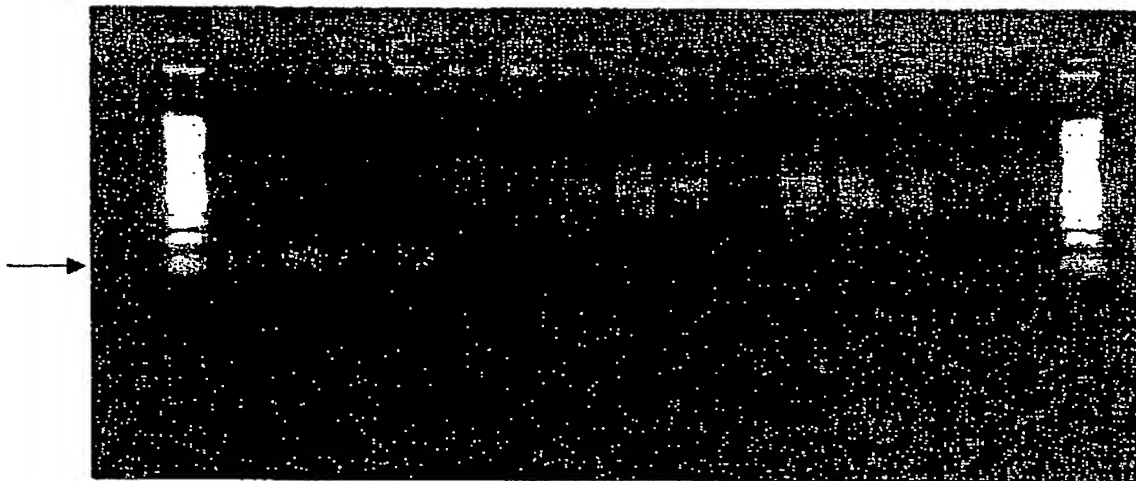
6 ウマ
7 ウサギ
8 クジラ
9 ニワトリ
10 タラ

11 サケ
12 イワシ
13 カニ
14 エビ
15 アサリ
M マーカ

【図5】

反芻動物検出プライマーによるPCR

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M



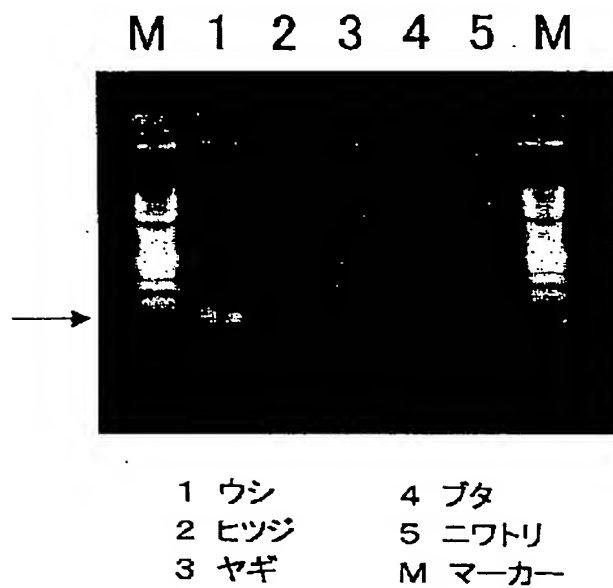
1 肉牛
2 乳牛
3 ヒツジ
4 ヤギ
5 ブタ

6 ウマ
7 ウサギ
8 クジラ
9 ニワトリ
10 タラ

11 サケ
12 イワシ
13 カニ
14 エビ
15 アサリ
M マーカ-

【図6】

ウシ特異的プライマー(cow3, cow51)
によるウシ由来DNA配列の特異的検出



【図7】

ウシプライマーによるウシDNA配列の検出の比較

M 1 2 3 4 5 M 1 2 3 4 5 M 1 2 3 4 5 M



プライマー対

cow 52 cow 53 cow 54 cow 31
cow 3 cow 3 cow 3

1 ウシ 2 ヒツジ 3 ヤギ 4 ブタ 5 ニワトリ M マーカー

【図8】

ウシプライマーによるウシDNA配列の検出の比較

M 1 2 3 4 5 M 1 2 3 4 5 M 1 2 3 4 5 M



プライマー対

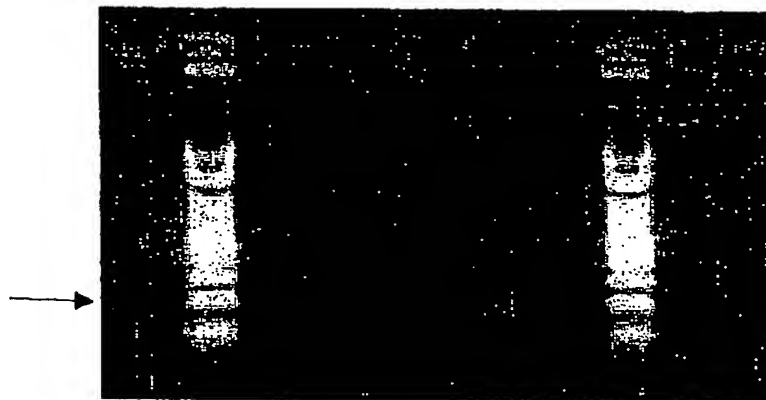
cow 51 cow 52 cow 53 cow 54
cow 31 cow 31 cow 31 cow 31

1 ウシ 2 ヒツジ 3 ヤギ 4 ブタ 5 ニワトリ M マーカー

【図9】

ブタ特異的プライマーによる
ブタ由来DNA配列の検出

M 1 2 3 4 5 M

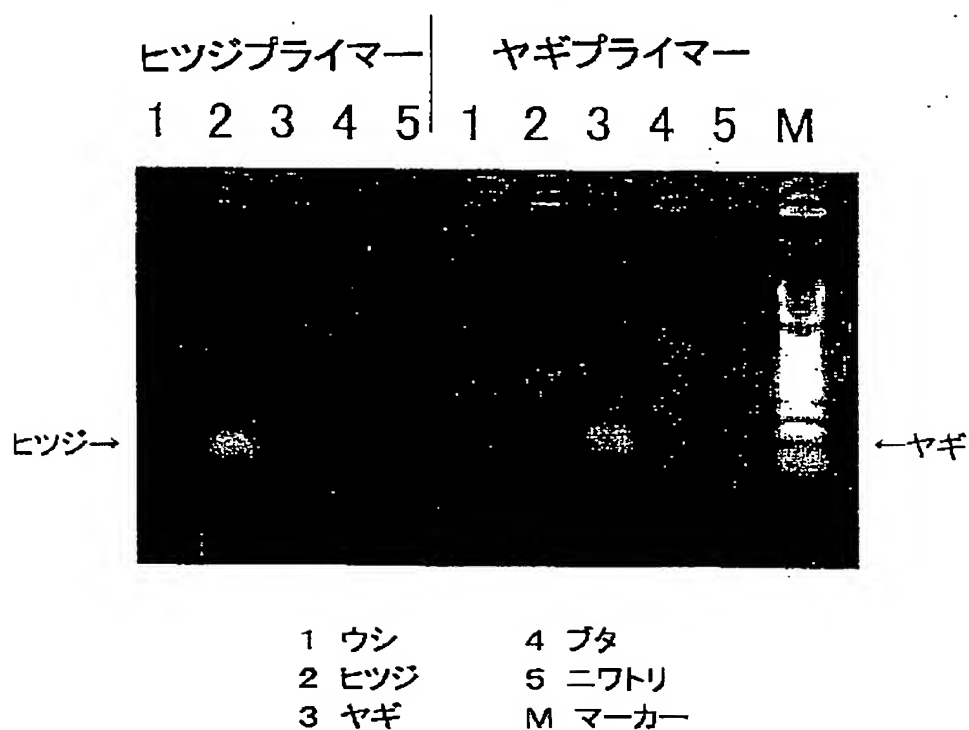


1 ウシ
2 ヒツジ
3 ヤギ

4 ブタ
5 ニワトリ
M マーカー

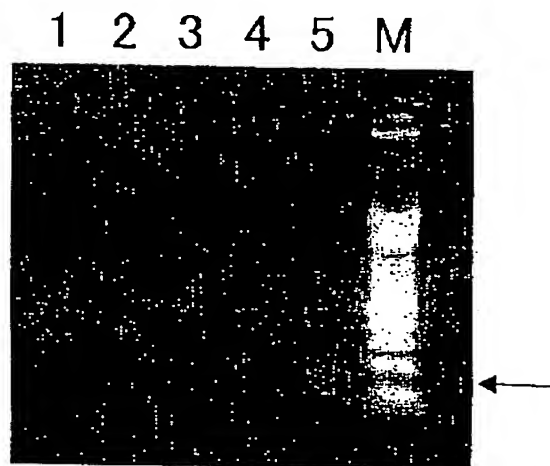
【図10】

ヒツジおよびヤギ特異的プライマーによる
ヒツジおよびヤギDNA配列の検出



【図11】

ニワトリ特異的プライマーによる
ニワトリ由来DNA配列の検出

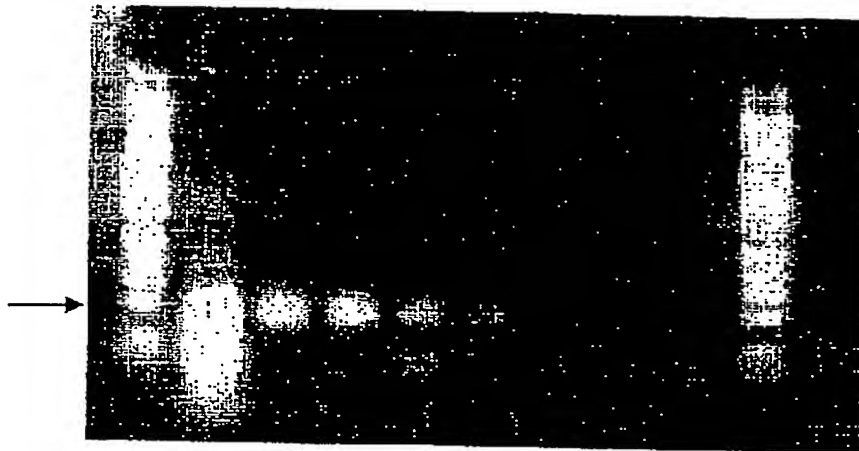


1 ウシ	4 ブタ
2 ヒツジ	5 ニワトリ
3 ヤギ	M マーカー

【図12】

哺乳動物特異的プライマーによる
ウシ由来肉骨粉を含む配合飼料からの
DNA配列の検出

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

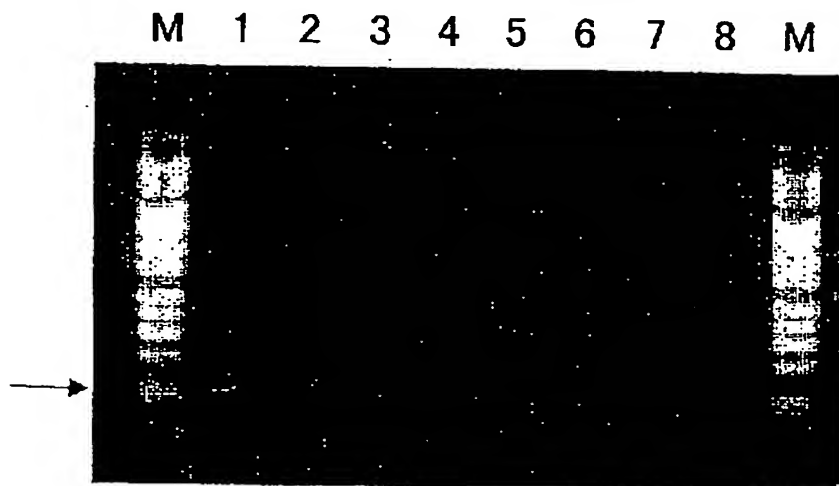


飼料中の肉骨粉の混入率

1, 100%, 2, 10%, 3, 1%, 4, 0.1%, 5, 0.01%
6, 0.001%, 7, 0.0001%, 8, 無添加, M, マーカ-

〔図13〕

反芻動物特異的プライマーによる
ウシ由来肉骨粉を含む配合飼料からの
DNA配列の検出



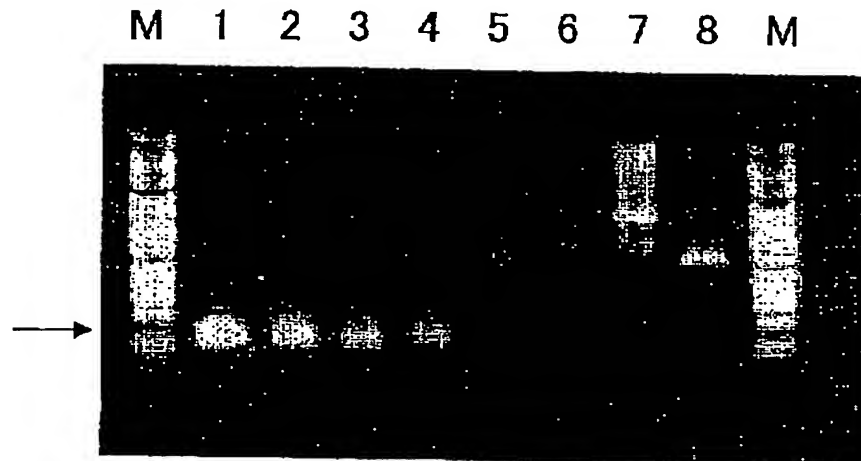
飼料中の肉骨粉の混入率

1, 100%, 2, 10%, 3, 1%, 4, 0.1%, 5, 0.01%

6, 0.001%, 7, 0.0001%, 8, 無添加, M, マーカ-

〔図14〕

ウシ特異的プライマーによる
ウシ由来肉骨粉を含む配合飼料からの
DNA配列の検出



飼料中の肉骨粉の混入率

1, 100%, 2, 10%, 3, 1%, 4, 0.1%, 5, 0.01%

6, 0.001%, 7, 0.0001%, 8, 無添加, M, マーカ―

フロントページの続き

Ｆターム(参考) 4R024 AA20 BA07 CA01 HA19
4B053 QA13 QQ14 QQ59 QR32 QR40
QR62 QS16 QS25

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication No.
2003-164287

Date of Laid-Open: June 10, 2003

Application No. 2001-366120

Filing date: November 30, 2001

Applicants: National Institute of Agrobiological Sciences and
Fertilizer and Feed Inspection Services

Inventors: Toyoko KUSAMA and Koichi KADOWAKI

Title of the Invention:

Primer Sequences

Abstract:

[Problems to be Solved] To provide a method for detecting an animal-derived DNA sequence specifically.

[Means for Solving the Problems] The present invention provides a method for identifying animal species, said method comprises a step of amplifying a DNA fragment by PCR using a DNA in a sample as a template and animal-specific gene sequences as a primer pair, wherein the animal-specific gene sequences are derived from a ATP synthase subunit 8 gene of a mitochondrial genome; and a step of detecting the amplified DNA fragment.

Claims:

1. A method for identifying animal species comprising: a step of amplifying a DNA fragment by PCR using a DNA in a sample as a template and animal-specific gene sequences as a primer pair, wherein

the animal-specific gene sequences are derived from a ATP synthase subunit 8 gene of a mitochondrial genome; and a step of detecting the amplified DNA fragment.

2. The method of claim 1, wherein the animal is a mammal.

3. The method of claim 2, wherein the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 1 and the sequence of SEQ ID NO: 2.

4. The method of claim 1, wherein the animal is a ruminant.

5. The method of claim 4, wherein the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 3 and the sequence of SEQ ID NO: 4.

6. The method of claim 1, wherein the animal is a cattle.

7. The method of claim 6, wherein the primer pair is a combination selected from the group consisting of the following sequence combinations: SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 8 and SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 10; and SEQ ID NO: 6 and SEQ ID NO: 10.

8. The method of claim 1, wherein the animal is a pig.

9. The method of claim 8, wherein the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 13 and the sequence of

SEQ ID NO: 14.

10. The method of claim 1, wherein the animal is a sheep.

11. The method of claim 10, wherein the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 17 and the sequence of SEQ ID NO: 18.

12. The method of claim 1, wherein the animal is a goat.

13. The method of claim 12, wherein the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 19 and the sequence of SEQ ID NO: 20.

14. The method of claim 1, wherein the animal is a chicken.

15. The method of claim 14, wherein the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 23 and the sequence of SEQ ID NO: 24.

16. The method of any one of claims 1 to 15, wherein the sample is selected from a group consisting of raw meat, processed meat food products, food products containing processed meat, blood, hair, body fluids, milk, milk processing products, meat and bonemeal, and feed containing meat and bonemeal.

17. A primer pair for detection of a mammal-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 1 and the sequence of SEQ ID NO: 2.

18. A primer pair for detection of a ruminant-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 3 and the sequence of SEQ ID NO: 4.
19. A primer pair for detection of a cattle-specific gene, the primer pair being a combination selected from the group consisting of the following sequence combinations: SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 8 and SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 10; and SEQ ID NO: 6 and SEQ ID NO: 10.
20. A primer pair for detection of a pig-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 13 and the sequence of SEQ ID NO: 14.
21. A primer pair for detection of a sheep-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 17 and the sequence of SEQ ID NO: 18.
22. A primer pair for detection of a goat-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 19 and the sequence of SEQ ID NO: 20.
23. A primer pair for detection of a chicken-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 23 and the sequence of SEQ ID NO: 24.
24. A method for detecting animal-derived components present in

mixed feed comprising: a step of amplifying a DNA fragment by PCR using a DNA in a sample as a template and animal-specific gene sequences as a primer pair, wherein the animal-specific gene sequences are derived from a ATP synthase subunit 8 gene of a mitochondrial genome; and a step of detecting the amplified DNA fragment.

Page 2, right column, line 37 to page 8, right column, line 17

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] The present invention relates to methods for identifying animal species and primer pairs sequence used therein. More specifically, the present invention relates to methods for identifying animal species that include a step of amplifying an animal-specific gene sequence derived from the ATP synthase subunit 8 gene of a mitochondrial genome, and primer pairs sequence used in this amplification step.

[0002]

[Prior Art] Currently, there is a problem that cattle is infected with bovine spongiform encephalopathy (BSE) by giving feed containing meat and bonemeal derived from cattle infected with BSE. It has been shown that BSE-like diseases may be present in various livestock as well. Accordingly, since the emergence of BSE, there has been a need to develop sensitive and effective method to identify feed contaminated bone and bonemeal by using high technologies, and this has become a particularly urgent matter for authorities.

[0003]

Immunological methods and gene identification methods using nuclear gene conventionally have been used as methods for identifying animal species. Examples of immunological methods include ELISA

and immunoblotting. PCR is an example of a gene identification method using nuclear gene. However, there are many problems with methods for identifying the animal species that are currently employed. For example, in meat and bonemeal that has been heat-treated, there is a high likelihood that nucleic acids have been fragmented. Furthermore, since majority of feed in which meat and bonemeal has been mixed is composed of plant-derived material, it is necessary to analyze trace amounts of animal-derived components. There is a dire need for the development of a detection method that is highly sensitive and effective and that can be executed with respect to such heat-treated samples.

[0004]

[Problems to be Solved by the Invention] Accordingly, a method other than immunological methods and gene identification methods employing nuclear gene that is for detecting and identifying the animal species of animal-derived components that are present in trace amounts is desirable. In particular, it is crucial to identify the type of animal meat and meat and bonemeal used in feed given to livestock and pets. Furthermore, it is desirable that the detection method is highly sensitive and differentiates species of animal gene present in trace amounts from among large quantities of plant gene or gene of other animal species.

[0005]

[Means for Solving the Problems] The inventors of the present application focused on the mitochondrial genome, which is inherited maternally and exists in a greater number of copies than nuclear genome, and investigated the use of mitochondrial gene as a target for identifying animal species. Their research indicated that the homologous sequence with ATP synthase subunit 8 gene (atp8 gene)

from animal mitochondrial genome is not present in plant (*Oryza sativa*) mitochondrial genome. Thus, the inventors found that the gene derived from the atp8 gene can serve as a material for specific detection of trace amounts of animal gene among plant-based feed, in other word, plant atp8 gene is very diverged from animal atp8 gene, and also that specific sequences of the animal mitochondrial atp8 gene can be used to identify the animal species, thereby arriving at the present invention.

[0006] Therefore, the present invention provides a method for identifying animal species comprising: a step of amplifying a DNA fragment by PCR using a DNA in a sample as a template and animal-specific gene sequences as a primer pair, wherein the animal-specific gene sequences are derived from a ATP synthase subunit 8 gene of a mitochondrial genome; and a step of detecting the amplified DNA fragment.

[0007] In a preferred embodiment, the animal is a mammal, and further preferably, the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 1 and the sequence of SEQ ID NO: 2.

[0008] In a preferred embodiment, the animal is a ruminant, and further preferably, the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 3 and the sequence of SEQ ID NO: 4.

[0009] In a preferred embodiment, the animal is a cattle, and further preferably, the primer pair is a combination selected from the group consisting of the following sequence combinations: SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 8 and SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 10; and SEQ ID NO: 6 and SEQ ID NO: 10.

[0010] In a preferred embodiment, the animal is a pig, and further preferably, the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID

NO: 13 and the sequence of SEQ ID NO: 14.

[0011] In a preferred embodiment, the animal is a sheep, and further preferably, the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 17 and the sequence of SEQ ID NO: 18.

[0012] In a preferred embodiment, the animal is a goat, and further preferably, the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 19 and the sequence of SEQ ID NO: 20.

[0013] In a preferred embodiment, the animal is a chicken, and further preferably, the primer pair is a combination of the sequence of SEQ ID NO: 23 and the sequence of SEQ ID NO: 24.

[0014] In another embodiment, the sample is selected from a group consisting of raw meat, processed meat food products, food products containing processed meat, blood, hair, body fluids, milk, milk processing products, meat and bonemeal, and feed containing meat and bonemeal.

[0015] The present invention also provides a primer pair for detection of a mammal-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 1 and the sequence of SEQ ID NO: 2.

[0016] The present invention also provides a primer pair for detection of a ruminant-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 3 and the sequence of SEQ ID NO: 4.

[0017] The present invention also provides a primer pair for detection of a cattle-specific gene, the primer pair being a combination selected from the group consisting of the following sequence combinations: SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 8 and SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 10; and SEQ ID NO: 6 and SEQ ID NO: 10.

[0018] The present invention also provides a primer pair for detection of a pig-specific gene, the primer pair being a combination of the

sequence of SEQ ID NO: 13 and the sequence of SEQ ID NO: 14.

[0019] The present invention also provides a primer pair for detection of a sheep-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 17 and the sequence of SEQ ID NO: 18.

[0020] The present invention also provides a primer pair for detection of a goat-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 19 and the sequence of SEQ ID NO: 20.

[0021] The present invention also provides a primer pair for detection of a chicken-specific gene, the primer pair being a combination of the sequence of SEQ ID NO: 23 and the sequence of SEQ ID NO: 24.

[0022] Further, the present invention provides a method for detecting animal-derived components present in mixed feed, said method comprises: a step of amplifying a DNA fragment by PCR using a DNA in a sample as a template and animal-specific gene sequences as a primer pair, wherein the animal-specific gene sequences are derived from a ATP synthase subunit 8 gene of a mitochondrial genome; and a step of detecting the amplified DNA fragment.

[0023]

[Modes for Carrying out the Invention] The mitochondrial genome is essential for the biosynthesis of the enzymes required for oxidative phosphorylation (electron transport system), and mitochondrial DNA codes for ATP synthase and cytochrome c oxidase, and the like. ATP synthase is composed of several subunits, and as discussed above, the inventors found that the ATP synthase subunit 8 gene (atp8 gene) is present in the animal mitochondrial genome but homologous sequence with animal atp8 gene is not present in the plant (*Oryza sativa*) mitochondrial genome. It thus became possible to identify animal species even when plant-derived DNA is present in large quantities in the feed.

[0024] Several animal atp8 genes are known. For example, taking the cattle atp8 DNA sequence (cattle) as a reference, the atp8 gene sequences of several animal species were aligned so that homology with the cattle sequence is achieved, and this is shown in Fig. 1. Fig. 1 shows the gene sequence of the atp8 gene of 1: cattle, 2: alpaca, 3: cat, 4: dog, 5: goat (1), 6: goat (2), 7: horse, 8: antelope, 9: mouse, 10: rabbit, 11: rat, 12: donkey, 13: sheep, 14: deer, 15: sperm whale, and 16: razorback whale. It should be noted that the arrow in the diagram indicates the start position of the cattle atp8 reading frame.

[0025] Fig. 2 shows the atp8 genes of cattle, chicken, and pig aligned with one another.

[0026] As shown in Figs. 1 and 2, there is diversity of genes among the atp8 genes. This diversity can be used to detect specific sequences in various types of animals, thereby allowing various animal species to be identified.

[0027] To identify various types of animals, examples of methods for detecting a DNA sequence specific to an animal species include Southern Blotting and PCR (polymerase chain reaction). PCR is preferably used in the present invention because it permits detection even with very small DNA samples and it allows accuracy to be improved. In the present invention, PCR is carried out using a pair of primers including a DNA sequence specific to a target animal species, and a DNA fragment that is amplified is detected.

[0028] PCR is for example carried out as follows. First, two regions are selected as primers from any of regions of the atp8 gene and regions proximal thereto having a sequence specific to a target animal species, and the selected primers are synthesized. The primers are about 20 nucleotides in length respectively. Using this pair of primers, the DNA fragment of the region sandwiched between the two primers

is amplified by PCR. A sample containing the amplified DNA fragments is then subjected to electrophoresis to determine whether that DNA fragment is present.

[0029] A primer is a DNA sequence of nucleotides in any length, and is suitably selected based on the sequence alignment of the *atp8* genes of various types of animals in publicly available databases. For example, in order to detect a gene specific to mammals, a region having higher homology with mammals and low homology with non-mammals can be chosen. In order to detect a gene specific to a certain animal, a region having specificity to that animal and low specificity with other animals can be chosen. Since primers are used in pairs, two regions, that is, a region on the 5' side and a region on the 3' side, are selected. If more than two regions can be selected as primers, then it is possible to use various primer combinations.

[0030] For example, Fig. 3 shows a sequence of cattle mitochondrial *atp8* gene, and the markings in the diagram are the regions (sequences) that can be used as primers for detecting cattle-specific gene. Sequences for specifically detecting mammals (anicon5 (SEQ ID NO: 1) and anicon3 (SEQ ID NO: 2)) and sequences for specifically detecting ruminants (rumicon5 (SEQ ID NO: 3) and rumicon3 (SEQ ID NO: 4)) are also shown in Fig. 3. A more detailed explanation follows in the Examples. For example, mammal-specific gene sequence can be detected when anicon5 is used as the 5' primer and anicon3 is used as the 3' primer. Likewise, ruminant-specific gene sequence can be detected when rumicon5 and rumicon3 are used as primers. Alternatively, as the 5' primer, any one of cow5 (SEQ ID NO: 5), cow51 (SEQ ID NO: 6), cow52 (SEQ ID NO: 7), cow53 (SEQ ID NO: 8), and cow54 (SEQ ID NO: 9) is used, and as the 3' primer, either cow3 (SEQ ID NO: 10) or cow31 (SEQ ID NO: 11) is used. For example, the

primer pairs of cow52 and cow31, cow52 and cow3, cow54 and cow31, cow53 and cow3, cow54 and cow3, and cow51 and cow3 are capable of detecting cattle-specific gene sequences.

[0031] The regions surrounded by squares in Figs. 1 and 2 indicate examples of sequences used in tests for specifically detecting genes derived from the respective animal species.

[0032] The DNA sequences of the regions selected as primers are synthesized by normally employed methods. Generally, nucleotides are extended on a support medium using an automated DNA synthesizer, then removed from protecting group and cleaved from the support medium. Then, they can be purified using a normally employed method (such as column chromatography) to obtain primers of interest.

[0033] Samples that can be measured include raw meat, processed meat food products, food products containing processed meat, blood, hair, body fluids, milk, milk processing products, meat and bonemeal, and feed containing meat and bonemeal. Extraction of mitochondrial DNA from these samples is, for example, performed as follows. Approximately 50 mg to 500 mg of a sample (for example, 50 mg in the case of raw meat, 100 mg to 500 mg in the case of a dried powder sample) is suspended in about 10 times that amount of buffered solution, ground using a bead grinding method, for example, and then extracted using a commercially available tissue cell mitochondrial DNA extraction kit (manufactured by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., for example). Such kits allow purer mitochondrial DNA to be collected in that little genome DNA in the tissue cells is contaminated. For example, to the sample ground is added a reagent in the kit, and centrifuged, and the pellets are collected. It is thus possible to more efficiently extract mitochondrial DNA with little contamination of

genome DNA, which is present in large quantities in the sample.

[0034] There are no particular limitations regarding the amount of primer used, but generally it is preferable that approximately 0.4 μM is used.

[0035] PCR is performed on the pretreated sample using the primer pair selected above, so as to amplify the DNA fragment of the region sandwiched between the primers. PCR is executed under conditions in which it is ordinarily performed, and conditions that are appropriate for each primer pair are set. For example, DNA fragment is, firstly, heat denatured at 95°C for 9 minutes; then subjected to the cycle of reactions of denaturing at 92°C for one minute, annealing at 40 to 65°C for two minutes, and extending at 72°C for two minutes, which is repeated 30 to 60 cycles; and finally, allowed to react at 72°C for five minutes to finish PCR. AmpliTaq GOLD polymerase is ordinarily used as the DNA polymerase. The size of the PCR product (DNA fragment) amplified by the primer pair can be approximately 120 bp to approximately 180 bp, although this varies depending on the number of bases between the primer pair that has been selected. The PCR product is then subjected to agarose gel electrophoresis, for example, under conditions in which the above DNA fragments can be separated.

[0036] The DNA fragments on the gel subjected to electrophoresis can be detected by detection means normally employed by those skilled in the art, such as ethidium bromide staining, fluorescence detection, and Southern hybridization.

[0037] Thus, if DNA derived from a species of interest is present in the sample, then, amplified DNA fragments can be detected on the gel. Limits to detection may vary depending on various factors, such as the type and combination of the primer pair used, the amount of sample, the PCR conditions, and the detection method. If appropriate

conditions are selected, then the presence of DNA can be detected with high sensitivity even in trace samples. For example, if appropriate conditions are selected when the sample is a mixed feed that contains cattle-derived meat and bonemeal, then contamination of only 0.001 wt% cattle meat and bonemeal in the feed can be detected using a specific cattle-specific primer pair.

[0038] It should be noted that the primer sequence has been specified in the Examples discussed below, but there is no intention to limit the present invention to the following Examples. It is intended that the present invention includes in its scope sequences that include those primer sequences, or those sequences with one or more base sequence substitutions, and sequences which by changing the hybridizing conditions can hybridize with a DNA of interest and allow a DNA derived from a specific animal species to be detected specifically.

[0039]

[Examples] (Primer Synthesis) Primer regions to be used in the following Examples and comparative Examples were selected based on the sequence alignment of the *atp8* gene of various animals shown in Figs. 1 and 2. The DNA sequences of the selected regions were synthesized using an automated DNA synthesizer.

[0040] (Example 1: Specific Detection of Mammal-Derived DNA Sequence) Mitochondrial DNAs from 15 types of meat samples, these being beef cattle, dairy cattle, sheep, goat, pig, horse, rabbit, whale, chicken, codfish, salmon, sardine, crab, prawn, and clam, were prepared as follows. Each meat sample was suspended in ten times that amount of buffered solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM EDTA, pH 7.5), ground using a bead grinding method, and then DNA was extracted.

[0041] With each of these DNA samples serving as a template, PCR

was performed using anicon5 (SEQ ID NO: 1) and anicon3 (SEQ ID NO: 2) as the 5' primer and the 3' primer, respectively. The PCR conditions were as follows: reaction buffer solution (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (w/v) gelatin); heat denaturing at 95°C for 9 minutes, followed by the cycle of reactions of denaturing at 92°C for one minute, annealing at 55°C for two minutes, and extending at 72°C for two minutes repeated 45 cycles, and lastly, the product was allowed to react at 72°C for five minutes. After the reaction, the reaction mixture was subjected to agarose gel electrophoresis, and the PCR product (DNA fragments) was detected by ethidium bromide staining. The results are shown in Fig. 4. In the diagram, M is the molecular weight marker.

[0042] As is clear from Fig. 4, by performing PCR using anicon5 (SEQ ID NO: 1) and anicon3 (SEQ ID NO: 2) as primers with each animal-derived DNA serving as a template, the amplified DNA fragments were observed only in mammals (band position indicated by the arrow). That is, it was demonstrated that by using anicon5 (SEQ ID NO: 1) and anicon3 (SEQ ID NO: 2) as the primer pair, it is possible to specifically detect only mammal-derived DNA from among various types of animal meat samples. Consequently, the combination of anicon5 (SEQ ID NO: 1) and anicon3 (SEQ ID NO: 2) is a primer pair that specifically detects the sequence derived from animal species of mammalian origin. The regions that can be used as primers for detecting sequences derived from mammals are shown in Fig. 3.

[0043] (Example 2: Specific Detection of Ruminant-Derived DNA Sequence) With the 15 types of DNA samples prepared in the same manner as in Example 1 serving as templates, PCR was performed using rumicon5 (SEQ ID NO: 3) and rumicon3 (SEQ ID NO: 4) as the 5' primer and the 3' primer, respectively. The PCR

conditions were as follows: heat denaturing at 95°C for 9 minutes, followed by the cycle of reactions of denaturing at 92°C for one minute, annealing at 45°C for two minutes, and extending at 72°C for two minutes repeated 45 cycles, and lastly, the product was allowed to react at 72°C for five minutes. After the reaction, the reaction mixture was subjected to agarose gel electrophoresis, and the PCR product (DNA fragments) was detected by ethidium bromide staining. The results are shown in Fig. 5.

[0044] As shown in Fig. 5, by performing PCR using rumicon5 (SEQ ID NO: 3) and rumicon3 (SEQ ID NO: 4) as primers with each animal-derived DNA serving as a template, DNA fragments derived from beef cattle, dairy cattle, sheep, and goat, which are ruminants, were observed (band position indicated by the arrow). On the other hand, PCR products (DNA fragments) could not be detected in the DNA samples of animals that were not ruminants. That is, it was demonstrated that by using rumicon5 (SEQ ID NO: 3) and rumicon3 (SEQ ID NO: 4) as the primer pair, it is possible to specifically detect only ruminant-derived DNA from various types of animal meat samples. Consequently, the combination of rumicon5 (SEQ ID NO: 3) and rumicon3 (SEQ ID NO: 4) is a primer pair that specifically detects the sequence derived from animal species of ruminant origin. The regions that can be used as the primers for detecting sequences derived from ruminants are shown in Fig. 3.

[0045] It should be noted that in rumicon5 (SEQ ID NO: 3), "r" is "g" or "a", and "k" is "g" or "t". That is, rumicon5 (SEQ ID NO: 3) is a primer mixture, but it should be apparent to those skilled in the art that each can be used independently.

[0046] (Example 3: Specific Detection of Cattle-Derived DNA Sequence) Specific detection of a cattle-derived DNA sequence

was performed using the various primer pairs listed in Table 1. PCR was performed under the same conditions as those of Example 1, except that DNAs prepared from cattle, sheep, goat, pig, and chicken meat were served as templates. The results are shown in Figs. 6 to 8.

[0047]

[Table 1]

Primer		Annealing	Result	Figure
5' cow51	SEQ ID NO: 6	55°C 2min	○	Fig. 6
3' cow3	SEQ ID NO: 10			
5' cow52	SEQ ID NO: 7	52°C 2min	○	Fig. 7
3' cow3	SEQ ID NO: 10			
5' cow53	SEQ ID NO: 8	52°C 2min	○	Fig. 7
3' cow3	SEQ ID NO: 10			
5' cow54	SEQ ID NO: 9	52°C 2min	○	Fig. 7
3' cow3	SEQ ID NO: 10			
5' cow5	SEQ ID NO: 5	52°C 2min	×	Fig. 7
3' cow31	SEQ ID NO: 11			
5' cow51	SEQ ID NO: 6	56°C 2min	×	Fig. 8
3' cow31	SEQ ID NO: 11			
5' cow52	SEQ ID NO: 7	52°C 2min	○	Fig. 8
3' cow31	SEQ ID NO: 11			
5' cow53	SEQ ID NO: 8	56°C 2min	×	Fig. 8
3' cow31	SEQ ID NO: 11			
5' cow54	SEQ ID NO: 9	56°C 2min	○	Fig. 8
3' cow31	SEQ ID NO: 11			
5' cow5	SEQ ID NO: 5	46°C 2min	×	not shown
3' cow3	SEQ ID NO: 10			

[0048] The results shown in Fig. 6 indicate that if cow51 (SEQ ID NO: 6) and cow3 (SEQ ID NO: 10) are used as the primer pair, then DNA fragments the same size as the PCR product (DNA fragments) obtained from cattle-derived meat did not find when sheep, goat, pig, or chicken DNA served as templates. It is clear that the combination of cow52 and cow3 of Fig. 7 and the combination of cow52 and cow31 of Fig. 8 are particularly suitable primer pairs for cattle-specific DNA detection, because similar DNA fragments were not detected in the samples of other animal species. On the other hand, as shown in Fig. 7, when cow5 (SEQ ID NO: 5) and cow31 (SEQ ID NO: 11) are used as

the primer pair, a band of the same size as the DNA fragment obtained using a cattle DNA as a template was slightly found in sheep. Likewise, in Fig. 8, when the primer pair cow51 (SEQ ID NO: 6) and cow31 (SEQ ID NO: 11), and the primer pair cow53 (SEQ ID NO: 8) and cow31 (SEQ ID NO: 11) are used, a band the same size as the DNA fragment obtained using cattle DNA as a template was observed. Therefore, these primer pairs are not suitable for the specific detection of cattle-derived fragments.

[0049] (Example 4: Specific Detection of Pig-Derived DNA Sequence)
Specific detection of a pig-derived DNA sequence was performed using the various primer pairs listed in Table 2. PCR was performed under the same conditions as those of Example 1, except that DNAs prepared from cattle, sheep, goat, pig, and chicken meat were served as templates.

[0050]

[Table 2]

	Primer	Anealing	Result	Figure
5' pig5 3' pig3	SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 14	46°C 2min	×	not shown
5' pig51 3' pig3	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14	58°C 2min	○	Fig. 9
5' pig5 3' pig31	SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 15	46°C 2min	×	not shown
5' pig5 3' pig32	SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 16	46°C 2min	×	not shown
5' pig51 3' pig31	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 15	55°C 2min	×	not shown
5' pig51 3' pig32	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 16	55°C 2min	×	not shown

[0051] Fig. 9 shows the results obtained by using pig51 (SEQ ID NO: 13) and pig3 (SEQ ID NO: 14) as the primer pair. As is clear from Fig. 9, DNA fragment was detected only in the sample derived from pig meat (band position indicated by the arrow). Consequently, this primer pair is useful for specifically detecting pig-derived DNA

sequences. It should be noted that, although not shown, none of the combinations of pig5 (SEQ ID NO: 12) and pig3 (SEQ ID NO: 14), pig5 (SEQ ID NO: 12) and pig31 (SEQ ID NO: 15), pig5 (SEQ ID NO: 12) and pig32 (SEQ ID NO: 16), pig51 (SEQ ID NO: 13) and pig31 (SEQ ID NO: 15), and pig51 (SEQ ID NO: 13) and pig32 (SEQ ID NO: 16) were suitable for specific detection.

[0052] (Example 5: Specific Detection of Sheep-Derived DNA Sequence) Specific detection of a sheep-derived DNA sequence was performed using sheep5 (SEQ ID NO: 17) and sheep3 (SEQ ID NO: 18) as the 5' primer and the 3' primer, respectively. PCR was performed under the same conditions as those of Example 1, except that DNAs prepared from cattle, sheep, goat, pig, and chicken meat were served as templates and that the annealing conditions were set to two minutes at 46°C. The results are shown in Fig. 10.

[0053] These results demonstrate that specific detection of a sheep-derived DNA sequence is possible using sheep5 (SEQ ID NO: 17) and sheep3 (SEQ ID NO: 18) as the primer pair.

[0054] (Example 6: Specific Detection of Goat-Derived DNA Sequence) Specific detection of a goat-derived DNA sequence was performed using goat5 (SEQ ID NO: 19) and goat3 (SEQ ID NO: 20) as the 5' primer and the 3' primer, respectively. PCR was performed under the same conditions as those of Example 1, except that DNAs prepared from cattle, sheep, goat, pig, and chicken meat were served as templates and that the annealing conditions were set to two minutes at 46°C. The results are shown in Fig. 10.

[0055] These results demonstrate that specific detection of a goat-derived DNA sequence is possible using goat5 (SEQ ID NO: 19) and goat3 (SEQ ID NO: 20) as the primer pair.

[0056] Also, PCR was performed in the same manner as described

above except that goat5 (SEQ ID NO: 19) and goat31 (SEQ ID NO: 21) were used as the primer pair and the annealing conditions were set to two minutes at 54°C, however, this was not suitable for the specific detection of goat-derived DNA sequences (not shown).

[0057] (Example 7: Specific Detection of Chicken-Derived DNA Sequence) Specific detection of a chicken-derived DNA sequence was performed using the various primer pairs listed in Table 3 as the 5' and the 3' primers. PCR was performed under the same conditions as those of Example 1, except that DNAs prepared from cattle, sheep, goat, pig, and chicken meat were served as templates. The results obtained by using chick5 (SEQ ID NO: 22) and chick3 (SEQ ID NO: 24) as the primers are shown in Fig. 11.

[0058]

[Table 3]

Primer		Anealing	Result	Figure
5' chick5 3' chick3	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 24	46°C 2min	○	Fig. 1
5' chick51 3' chick3	SEQ ID NO: 23 SEQ ID NO: 24	50°C 2min	×	not shown
5' chick5 3' chick31	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 25	50°C 2min	×	not shown
5' chick51 3' chick31	SEQ ID NO: 23 SEQ ID NO: 25	60°C 2min	×	not shown

[0059] As shown in Fig. 11, specific detection of a chicken-derived DNA sequence is possible using chick5 (SEQ ID NO: 22) and chick3 (SEQ ID NO: 24) as the primer pair (band position indicated by the arrow).

[0060] When chick51 (SEQ ID NO: 23) and chick3 (SEQ ID NO: 24), chick5 (SEQ ID NO: 22) and chick31 (SEQ ID NO: 25), and chick51 (SEQ ID NO: 23) and chick31 (SEQ ID NO: 25) were used as the primer pairs, the results were not suitable for the specific detection of chicken-derived DNA sequences (not shown).

[0061] (Example 11: Detection of Mammal-Derived Component in Mixed Feed) Meat and bonemeal derived from cattle (Australian bred) was mixed into mixed feed for livestock (main components: corn, milo, gluten feed, bran, rice bran, soy oil cake, rapeseed oil cake) at a predetermined ratio. Then, as in Example 1, 100 mg of the feed obtained was suspended in ten times that amount of buffer solution, and ground by a bead grinding method. Then, mitochondrial DNA was extracted using a commercially available tissue cell mitochondrial DNA extraction kit (manufactured by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan). Using this DNA as a template, PCR was performed under the same conditions as in Example 1 using anicon5 (SEQ ID NO: 1) and anicon3 (SEQ ID NO: 2), which are the primer pair for specifically detecting mammalian-derived DNA sequences used in Example 1. The results are shown in Fig. 12. Detection of mammal-derived DNA sequence was possible even in a case where the feed contained 0.01 wt% meat and bonemeal.

[0062] (Example 9: Detection of Ruminant-Derived Component in Mixed Feed) PCR was performed under the same conditions as in Example 2, except that DNA extracted from mixed feed in the same manner as in Example 8 was served as a template and that the primer pair rumicon5 (SEQ ID NO: 3) and rumicon3 (SEQ ID NO: 4) for specifically detecting ruminant-derived DNA sequences that is used in Example 2 was used. The results are shown in Fig. 13. Detection of ruminant-derived DNA sequence was possible even in a case where the feed contained 0.1 to 1 wt% meat and bonemeal.

[0063] (Example 10: Detection of Cattle-Derived Component in Mixed Feed) PCR was performed under the same conditions as in Example 3, except that DNA extracted from mixed feed in the same manner as in Example 8 was served as a template and that the cattlederived

DNA-specific primer pair of cow52 (SEQ ID NO: 7) and cow31 (SEQ ID NO: 11) that was used in Example 3 was used. The results are shown in Fig. 14. Detection of cattle-derived DNA sequence was possible even in a case where meat and bonemeal was only contained in the feed at a mere 0.001 wt%.

[0064]

[Effect of the Invention] Using the method of the present invention, it is possible to detect, with high sensitivity, trace amounts of animal-derived DNA in a sample. It is thus applicable to identify the animal species of trace amounts of meat and bonemeal mixed into feed. More particularly, detection is possible even if trace amounts of cattle-derived meat and bonemeal are mixed into mixed feed for livestock.

Page 11, left column, line 28 to page 12, left column, line 1

[Brief Description of the Drawings]

Fig. 1 is a diagram showing a sequence alignment of mitochondrial atp8 genes derived from various types of animals.

Fig. 2 is a diagram showing a sequence alignment of chicken, cattle, and pig mitochondrial atp8 genes.

Fig. 3 is a diagram showing the positional relationship on the mitochondrial atp8 gene of the primers used to specifically detect cattle-derived DNA sequences.

Fig. 4 is a photograph showing the results of electrophoresis after performing PCR using a primer pair (anicon5 and anicon3) having mammal-specific sequences and with DNAs derived from various types of animals serving as templates.

Fig. 5 is a photograph showing the results of electrophoresis after performing PCR using a primer pair (rumicon5 and rumicon3) having ruminant-specific sequences and with DNAs derived from

various types of animals serving as templates.

Fig. 6 is a photograph showing the results of electrophoresis after performing PCR using a primer pair (cow3 and cow51) having cattle-specific sequences and with DNAs derived from various types of animals serving as templates.

Fig. 7 is a photograph showing the results of electrophoresis after performing PCR using various primer pairs having cattle-specific sequences and with DNAs derived from various types of animals serving as templates.

Fig. 8 is a photograph showing the results of electrophoresis after performing PCR using various primer pairs having cattle-specific sequences and with DNAs derived from various types of animals serving as templates.

Fig. 9 is a photograph showing the results of electrophoresis after performing PCR using a primer pair (pig51 and pig3) having pig-specific sequences and with DNAs derived from various types of animals serving as templates.

Fig. 10 is a photograph showing the results of electrophoresis after performing PCR using a primer pair (sheep5 and sheep3) having sheep-specific sequences and a primer pair (goat5 and goat3) having goat-specific sequences, and with DNAs derived from various types of animals serving as templates.

Fig. 11 is a photograph showing the results of electrophoresis after performing PCR using a primer pair having chicken-specific sequences and with DNAs derived from various types of animals serving as templates.

Fig. 12 is an electrophoresis photograph showing the results of the detection of DNA, using mammal-specific primer pairs, using various primer pairs, in mixed feed for livestock that contains cattle

meat and bonemeal.

Fig. 13 is an electrophoresis photograph showing the results of the detection of DNA, using ruminant-specific primer pairs, in mixed feed for livestock that includes cattle meat and bonemeal.

Fig. 14 is an electrophoresis photograph showing the results of the detection of DNA, using cattle-specific primer pairs, in mixed feed for livestock that contains cattle meat and bonemeal.